

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang dan Laboratorium Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Pertanian Peternakan Universitas Muhammadiyah Malang pada Bulan Agustus – Oktober 2020.

#### 3.2 Bahan dan Alat

##### 3.2.1 Bahan

Bahan utama dari penelitian ini berupa kitosan cangkang rajungan biru yang didapatkan di CV. Phy Edumedia, jahe merah (umur panen 12 bulan) dari Karangploso, Kabupaten Malang. Bahan kimia yang digunakan adalah aquades,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1%, gliserol, NaOH, HCl, larutan NaCl, dan silica gel yang didapatkan dari Toko Makmur Malang dan CV. Phy Edumedia.

##### 3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan *edible film* antara lain kain saring, aluminium foil, plat kaca loyang, *hot plate*, *thermometer*, *cabinet dryer*, *magnetic stirrer*, neraca analitik, (pioner TM, dhaus), mikrometer skrup, spektrofotometri (*genesys 20 thermo spectonic*), *sentrifuse (PIC series)*, mikrometer, *vortex*, alat pengukur elastisitas (*digital gauge HF 500*), alat pengukur warna (*digital colorimeter test T 135*), plastik, gunting, gelas beaker merk Iwaki Pyrex, tabung reaksi merk Iwaki Pyrex, autoclave model no. 1925x nomor seri B0004136, Inkubator merk Incucell MMM.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) Faktorial yang disusun dengan 2 faktor yaitu konsentrasi larutan kitosan cangkang rajungan dan konsentrasi filtrat jahe merah. Faktor pertama adalah konsentrasi larutan kitosan cangkang rajungan (2%, 3%, dan 4%), sedangkan faktor kedua adalah konsentrasi filtrat jahe merah (0%, 5%, dan 10%). Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Analysis of Variant (ANOVA) dan dilanjutkan uji Duncan (DMRT) dengan taraf nyata 5% ( $\alpha=0.05$ ).

Faktor ke-1 konsentrasi larutan kitosan cangkang rajungan (K), terdiri dari 3 taraf:

K1 = konsentrasi larutan kitosan cangkang rajungan 2% b/v total

K2 = konsentrasi larutan kitosan cangkang rajungan 3% b/v total

K3 = konsentrasi larutan kitosan cangkang rajungan 4% b/v total

Faktor ke-2 konsentrasi filtrat jahe merah (J), terdiri dari 3 taraf:

J1 = konsentrasi filtrat jahe merah 0% v/v total

J2 = konsentrasi filtrat jahe merah 5% v/v total

J3 = konsentrasi filtrat jahe merah 10% v/v total

Terdapat 9 kombinasi perlakuan: K1J1, K1J2, K1J3, K2J1, K2J2, K2J3, K3J1, K3J2, K3J3 diulang sebanyak 3 kali ulangan sehingga terdapat 27 unit percobaan.

Tabel 4. Pengacakan dan Pengelompokan Unit Percobaan

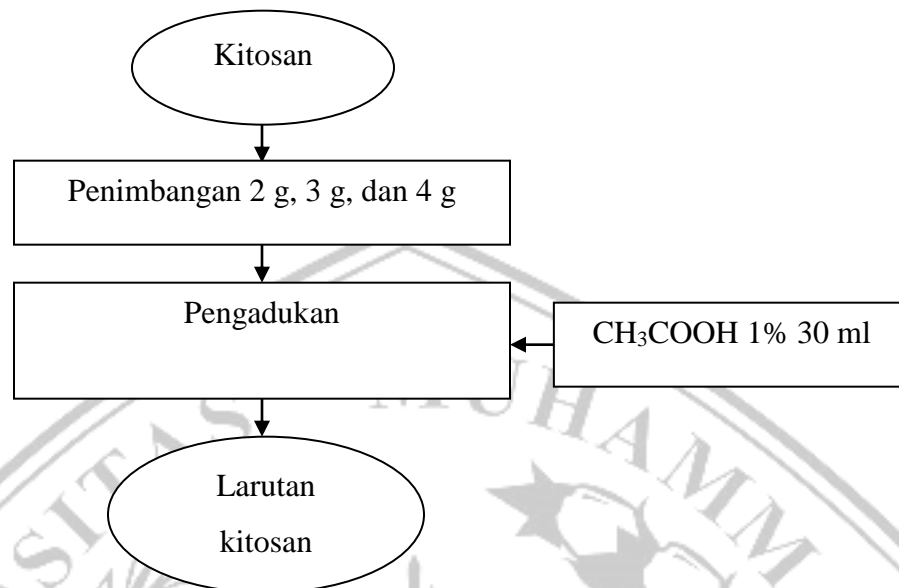
Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III
K3J1 (I)	K2J1 (II)	K2J3 (III)
K2J2 (I)	K2J2 (II)	K1J1 (III)
K3J2 (I)	K1J3 (II)	K1J2 (III)
K1J2 (I)	K1J1 (II)	K2J1 (III)
K1J3 (I)	K2J3 (II)	K3J1 (III)
K2J1 (I)	K3J3 (II)	K2J2 (III)
K2J3 (I)	K3J2 (II)	K3J3 (III)
K1J1 (I)	K1J2 (II)	K3J2 (III)
K3J3 (I)	K3J1 (II)	K1J3 (III)

Parameter penelitian yang diamati adalah ketebalan *edible film*, kekuatan tarik, elongasi, pengukuran kecepatan transfer uap air, transparansi, kelarutan, dan zona hambat bakteri.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Pembuatan Stok Larutan Kitosan

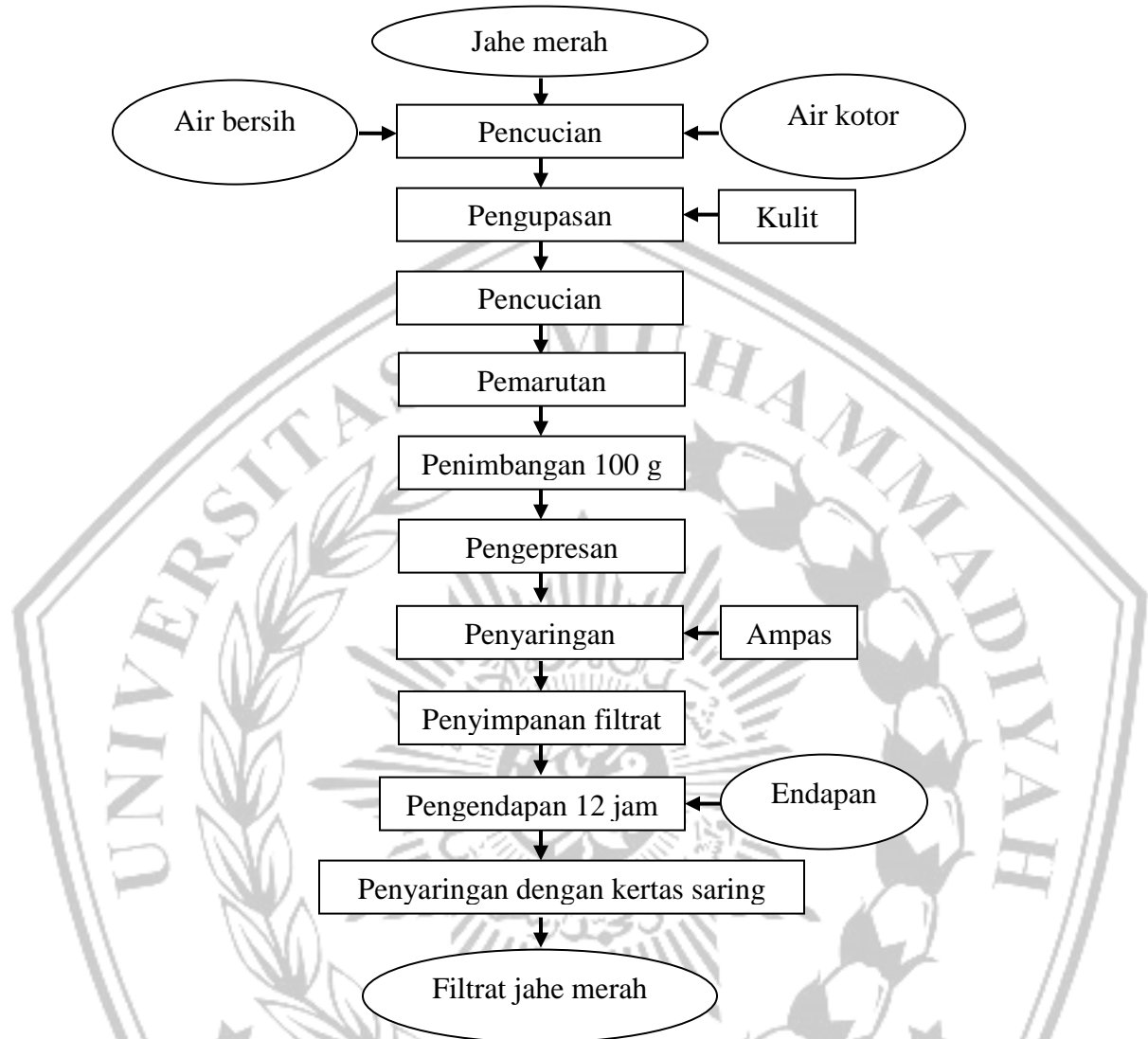
Pembuatan stok larutan kitosan mengacu pada Al ummah (2013). Pembuatan stok larutan kitosan 2%, 3%, dan 4% yaitu dengan cara menimbang kitosan masing-masing perlakuan sebanyak 2 g, 3 g, dan 4 g. Kemudian masing-masing perlakuan dimasukkan ke dalam *beaker glass* ukuran 100 ml dan ditambahkan asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 1% sebanyak 30 ml.



Gambar 6. Diagram Alir Proses Pembuatan Stok Larutan Kitosan (Ummah, 2013)

#### 3.4.2 Pembuatan Filtrat Jahe Merah

Filtrat jahe merah dibuat dengan cara mengupas dan membersihkan jahe sebanyak 1 kg. Kemudian jahe diparut dan disaring menggunakan kertas saring kasar untuk menghasilkan filtrat.



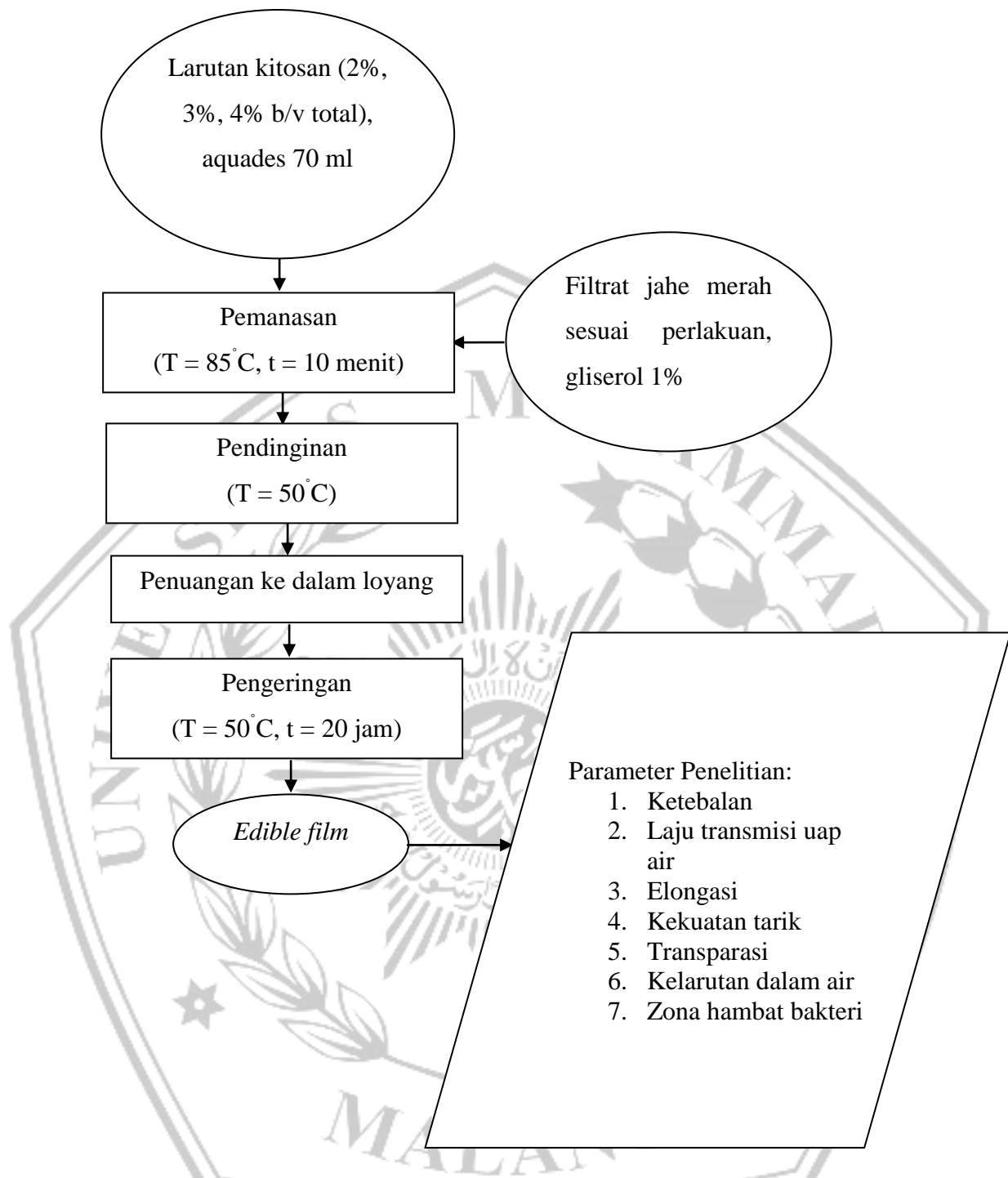
Gambar 7. Diagram Alir Proses Pembuatan Filtrat Jahe Merah (Mulyani, 2010)

### 3.4.3 Pembuatan *Edible Film* dengan Penambahan Filtrat Jahe

Pembuatan *edible film* didasarkan pada metode yang telah dilakukan oleh Jeon (2002) dengan modifikasi. Larutan kitosan sesuai konsentrasi ditambah aquades sebanyak 70 ml. Larutan lalu diaduk dan dipanaskan pada suhu 85°C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan filtrat jahe merah dengan variasi 0%, 5%, 10% v/v dan gliserol 1% sambil diaduk hingga gelembung hilang atau berkurang. Larutan

kemudian dituang pada plat kaca yang telah dilapisi dengan plastik PP dan dikeringkan pada pengeringan kabinet suhu 50°C selama 20 jam. Setelah kering, plat beserta *film* didinginkan pada suhu ruang selama 15 menit. *Film* kemudian dilepas dari plat plastik dan selanjutnya dianalisis sifat fisik, mekanik, *barrier*, dan antibakteri. Parameter yang diamati meliputi kuat tarik, persen pemanjangan, ketebalan, laju transmisi uap air, kelarutan dalam air, transparansi, dan zona hambat bakteri *Escherichia coli*.





Gambar 8. Diagram Alir Pembuatan *Edible Film* (Jeon, 2002)

### 3.5 Parameter Penelitian

#### 3.5.1 Analisa Ketebalan *Edible Film* (ASTM D882-12, 2012)

1. Sampel diukur ketebalannya menggunakan mikrometer sekrup dengan ketelitian 0,01 mm
2. Pengukuran dilakukan pada lima titik *film* yang berbeda
3. Rata-rata yang dihasilkan ditetapkan menjadi nilai ketebalan *edible film*.

#### 3.5.2 Analisa Elongasi *Edible Film* (ASTM D882-12, 2012)

1. Sampel *edible film* dipotong ukuran 20 mm x 50 mm
2. Elongasi pada *edible film* diuji menggunakan alat *Universal Testing Machine*
3. Elongasi adalah kemampuan rentang pada *edible film* yang dihasilkan

Elongasi pada *edible film* dihitung dengan rumus:

$$\text{Elongasi (\%)} = \frac{d \text{ after} - d \text{ before (mm)}}{d \text{ before (mm)}} \times 100\%$$

Keterangan:

d = penjepit antara pemegang sampel sebelum dengan sampel setelah ditarik hingga putus.

#### 3.5.3 Analisa Kuat Tarik *Edible Film* (ASTM D882-12, 2012)

1. Sampel *edible film* dipotong ukuran 20 mm x 50 mm
2. Kuat tarik pada *edible film* diuji menggunakan alat *Universal Testing Machine*
3. Sampel *edible film* akan diuji dengan pemberian beban dan ditarik
4. Nilai kuat tarik dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Kuat tarik} = \frac{\text{tegangan maksimum (Fmax)}}{\text{luas penampang melintang (A)}}$$



Keterangan:

F = Gaya tekan (N)

A = Luas permukaan (cm<sup>2</sup>)

#### 3.5.4 Analisa Transparansi *Edible Film* (Al-Hasan dan Norziah, 2012)

1. Sampel *edible film* dipotong ukuran kuvet (1 cm x 4 cm)
2. *Edible film* dimasukkan kedalam kuvet kaca
3. Transparansi *edible film* diukur menggunakan alat *spectrophotometer uv-vis* pada panjang gelombang 546 nm
4. Nilai transparansi dihitung menggunakan rumus:

$$T = \frac{A}{X}$$

Keterangan:

T = Transparansi

A = Nilai absorbansi

X = Ketebalan

#### 3.5.5 Analisa Kelarutan *Edible Film* (Saberi, 2015)

1. Sampel *edible film* dipotong ukuran 1 cm x 1 cm
2. Ditimbang berat awal sampel yang akan diuji (W<sub>0</sub>)
3. Sampel dimasukkan kedalam cawan porselen yang berisi aquades 15 ml selama 10 menit
4. Sampel yang telah direndam diangkat, kemudian air yang terdapat pada cawan porselen dibuang dan dibersihkan dengan *tissue*
5. Sampel dikeringkan menggunakan oven selama 24 jam

6. Sampel ditimbang berat akhir (W1), sehingga diperoleh presentase air yang terserap
7. Presentase kelarutan dari *edible film* dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kelarutan (\%)} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100\%$$

Keterangan:

W0 = Berat awal (g)

W1 = Berat akhir (g)

#### **3.5.6 Analisa Laju Transmisi Uap Air *Edible Film* (ASTM D882-12, 2012)**

1. Sampel *edible film* dipotong dengan ukuran 7 cm x 7 cm
2. Cawan porselen ukuran 30 ml atau yang memiliki luas penampang sama diisi dengan 2 gram *silica gel*
3. Bagian atas cawan porselen ditutup dengan sampel *edible film* dan direkatkan menggunakan karet
4. Cawan porselen yang sudah ditutup dengan *edible film* ditimbang sebagai berat awal
5. Cawan porselen tersebut dimasukkan kedalam toples kaca yang sudah diisi dengan 100 ml larutan NaCl 40% (RH = 75%) pada suhu 25°C
6. Toples ditutup dengan rapat
7. Cawan porselen ditimbang setiap 24 jam selama 6 hari

8. Berat cawan dari data yang diperoleh dibuat persamaan regresi linear, sehingga diperoleh *slope* kenaikan berat cawan (g/hari) dibagi dengan luas permukaan film yang diuji (m<sup>2</sup>)
9. Laju transmisi uap air dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Laju Transmisi Uap Air} = \frac{\Delta W}{A \times t}$$

Keterangan:

W = Perubahan berat film setelah 24 jam

t = Waktu (jam)

A = Luas permukaan (cm<sup>2</sup>)

### **3.5.7 Analisa Daya Hambat Bakteri *Eschericia coli Edible Film* (Miksusanti, 2013)**

#### **1. Persiapan Media Padat Natrium Agar (NA)**

Serbuk Natrium Agar (NA) sebanyak 2 gram dilarutkan ke dalam aquades 100 ml, kemudian dipanaskan dan diaduk diatas *hot plate* sampai mendidih. Setelah itu, media dimasukkan dalam Erlenmeyer, ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Media disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didinginkan dalam suhu ruang.

#### **2. Uji Aktivitas Antimikroba**

Sampel *edible film* dipotong dengan diameter 5 mm. Disiapkan media NA yang sudah memadat. Diambil inoculum sebanyak 1 ose, dimasukkan ke dalam tabung reaksi pengenceran I dan diambil sebanyak 0,1 ml menggunakan mikropipet kemudian diencerkan hingga pengenceran ke 10<sup>5</sup> CFU/ml, dimasukkan dalam cawan petri yang sudah berisi media NA padat dan di *spread*

*plate* menggunakan batang L. Selanjutnya sampel *edible film* yang telah dipotong dengan diameter 5 mm ditempelkan, ditunggu selama 5 menit untuk diwrap. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

### 3. Pembacaan Zona Hambat Bakteri

Pembacaan aktivitas antimikroba yaitu dengan cara diukurnya zona bening yang muncul disekitar sampel *edible film* pada cawan petri dan dikur menggunakan jangka sorong (dalam satuan mm).

